

P/ ENT COOPERATION TREAT

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 02 November 2000 (02.11.00)	
International application No.: PCT/JP00/02596	Applicant's or agent's file reference: 00005WO0
International filing date: 20 April 2000 (20.04.00)	Priority date: 23 April 1999 (23.04.99)
Applicant: TAGAWA, Toshiaki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
20 April 2000 (20.04.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

MATSUYAMA, Naoyuki  
Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals,  
Inc.  
2-6, Nihonbashi-honcho 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-8405  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 May 2000 (16.05.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 00005W00	International application No. PCT/JP00/02596

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION (for all designated States except US)  
TAGAWA, Toshiaki et al (for US)

International filing date : 20 April 2000 (20.04.00)

Priority date(s) claimed : 23 April 1999 (23.04.99)

23 April 1999 (23.04.99)

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 05 May 2000 (05.05.00)

List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, CA, CN, JP, KR, US

## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase  
☒ confirmation of precautionary designations  
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Y. KUWAHARA

Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## P A T E N T COOPERATION TREATY

PCT

input? (7/9/00) (1)

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MATSUYAMA, Naoyuki  
Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals,  
Inc.  
2-6, Nihonbashi-honcho 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-8405  
JAPON

225  
二本

Date of mailing (day/month/year) 29 June 2000 (29.06.00)	
Applicant's or agent's file reference 00005W00	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/02596	International filing date (day/month/year) 20 April 2000 (20.04.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 23 April 1999 (23.04.99)
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
23 April 1999 (23.04.99)	11/115737	JP	09 June 2000 (09.06.00)
23 April 1999 (23.04.99)	11/115738	JP	09 June 2000 (09.06.00)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Somsak Thiphrakesone

Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/64413  
PCT/JP00/02596

**PCT**

From the INTERNATIONAL BUREAU

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:  
MATSUYAMA, Naoyuki  
Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals,  
Inc.  
2-6, Nihonbashi-honcho 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-8405  
JAPON



<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 02 November 2000 (02.11.00)		
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 00005WO0		<b>IMPORTANT NOTICE</b>
<b>International application No.</b> PCT/JP00/02596	<b>International filing date (day/month/year)</b> 20 April 2000 (20.04.00)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 23 April 1999 (23.04.99)
<b>Applicant</b> MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
**AU, KR, US**

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
**CA, CN, EP, JP**

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 02 November 2000 (02.11.00) under No. WO 00/64413

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  <p style="text-align: center;">J. Zahra</p> Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT COOPERATION TREATY



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To:

MATSUYAMA, Naoyuki  
Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals,  
Inc.  
2-6, Nihonbashi-honcho 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-8405  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 02 November 2000 (02.11.00)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference 00005W00			
International application No. PCT/JP00/02596	International filing date (day/month/year) 20 April 2000 (20.04.00)	Priority date (day/month/year) 23 April 1999 (23.04.99)	
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, CA, CN, JP, KR, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until **31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL  
OF COPIES OF TRANSLATION  
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MATSUYAMA, Naoyuki  
Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals,  
Inc.  
2-6, Nihonbashi-honcho 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-8405  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 25 April 2001 (25.04.01)	
Applicant's or agent's file reference 00005W00	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/02596	International filing date (day/month/year) 20 April 2000 (20.04.00)
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION et al	

## 1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

## 2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AU,CA,CN,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

JP,KR

**CORRECTED  
VERSION**

## 3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Elliott Peretti  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

167  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 00005 WOO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02596	International filing date (day/month/year) 20 April 2000 (20.04.00)	Priority date (day/month/year) 23 April 1999 (23.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 9/127, 47/48, 39/395, A61P 35/00		
Applicant MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

CORRECTED  
VERSION

Date of submission of the demand 20 April 2000 (20.04.00)	Date of completion of this report 19 October 2000 (19.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02596

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. \_\_\_\_\_  
PCT/JP00/02596

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 28

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 28 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of claim 28 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require a preliminary examination by this International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(iv).

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 28

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02596

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9,15-27	YES
	Claims	10-14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Document 1: EP, 526700, A (Mitsubishi Kasei Corp.), 10 February, 1993 (10.02.93)

### Claims 10-14

The subject matter of claim 10-14 does not appear to involve an inventive step in view of document 1 cited in the ISR.

Document 1 does not contain disclosures to the effect that 0.1~2mol% of the thiol-modified antibody is used per mol of maleimide groups, but it does contain the disclosure '0.1~20%mol of the thiol-modified antibody is used per mol of maleimide groups', and moreover it is considered that optimizing this range so that the drug remains at a high level in the blood merely involves a person skilled in the art exercising normal creative ability.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

松山 直行

殿

あて名

〒 103-0023

東京都中央区日本橋本町2丁目2番6号  
三菱東京製菓株式会社法務部

PCT見解書

(法第13条)  
[PCT規則66]発送日  
(日.月.年)

01.08.00

出願人又は代理人  
の書類記号

00005W00

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/02596

国際出願日

(日.月.年) 20.04.00

優先日

(日.月.年) 23.04.99

国際特許分類 (IPC) Int. Cl. A61K47/48, A61K9/127, A61P35/00,  
A61K39/395

出願人 (氏名又は名称)

三菱化学株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
2. この見解書は、次の内容を含む。
- I ☒ 見解の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見
3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。
- いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。
- どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。
- なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。
- 応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 23.08.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)  
横尾 俊一

4 P

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- ☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 2 8

理由：

- ☒ この国際出願又は請求の範囲 2 8 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 2 8 は、治療による人体の処置方法であり、P C T 3 4 条(4)(a)(i)及びP C T 規則 6 7. 1 (iv) に該当するため、この国際予備審査機関が予備審査をすることを要しない対象に係るものである。

- ☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 2 8 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書 C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、見解書を作成することができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 2 7	有
	請求の範囲		無
進歩性 (I S)	請求の範囲	1 - 9, 1 5 - 2 7	有
	請求の範囲	1 0 - 1 4	無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲	1 - 2 7	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

請求項10-14について  
刊行物1: EP, 526700, A (Mitsubishi Kasei Corp.)  
10. 2月. 1993 (10. 02. 93)  
には、チオール化抗体をマレイミド基1molに対して0. 1%molから20%mol用いることが記載されている。

→ 抗体の規定 (0.1 ~ 2モル% など)      MCC-465の基本特許

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

REC'D 31 JUL 2001

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 00-102 TB	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02595	International filing date (day/month/year) 20/04/2000	Priority date (day/month/year) 23/04/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N1/14		
Applicant TSUKUBA BIOSYSTEM, LTD. et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.



2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand  27/10/2000	Date of completion of this report  27.07.2001
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:   European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer  Stolz, B  Telephone No. +49 89 2399 8416 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/JP00/02595

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

**Description, pages:**

1-12 as originally filed

**Claims, No.:**

1-9 as originally filed

**Drawings, sheets:**

1/6-6/6 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/JP00/02595

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

*(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)*

6. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims 1-9
	No: Claims
Inventive step (IS)	Yes: Claims 1-9
	No: Claims
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims 1-9
	No: Claims

2. Citations and explanations  
**see separate sheet**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

---

International application No. PCT/JP00/02595

1. Reasoned statement

1.1. The application discloses a procedure and an apparatus for culturing basidiomyces.

1.2. Novelty (Art. 33(2) PCT) and Inventive step (Art. 33(3) PCT)

The sequence of steps for culturing basidiomyces has not been disclosed in the cited prior art. Consequently, the method of claim 1 and dependent claims 2 to 6 are novel.

Claims 7 to 9 relate to bioreactors basically characterized by a pressurizable container, a gas inlet tube, a gas outlet tube with a means to regulate the pressure inside the vessel, and a means for agitating the liquid. The characterizing feature of the apparatus is its ability to work under pressures up to 0.5 MPa. Since no such apparatus is described in the cited prior art, novelty is acknowledged.

In view of the high yields obtained with the claimed method and apparatus, inventive step is also acknowledged.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8T

22/11

REC'D 06 NOV 2000  
PCT



特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の登録記号 00005W00	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02596	国際出願日 (日.月.年) 20.04.00	優先日 (日.月.年) 23.04.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl. A61K47/48, A61K9/127, A61P35/00, A61K39/395		
出願人(氏名又は名称) 三菱化学株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎  II <input type="checkbox"/> 優先権  III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如  V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献  VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備  VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 20.04.00	国際予備審査報告を作成した日 19.10.00
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 横尾 俊一 電話番号 03-3581-1101 内線 3490

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告 には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 28

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 28 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 28 は、治療による人体の処置方法であり、PCT 34 条(4)(a) (i) 及び PCT 規則 67. 1 (iv) に該当するため、この国際予備審査機関が予備審査をすることを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 28 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書 C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-27	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-9, 15-27	有
	請求の範囲	10-14	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-27	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: EP, 526700, A (Mitsubishi Kasei Corp.)  
10. 2月. 1993 (10. 02. 93)

請求の範囲10-14

請求の範囲10に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1より進歩性を有しない。

文献1には、チオール化抗体をマレイミド基1molに対して0.1~2モル%用いることについては記載されていないが、「チオール化抗体をマレイミド基1molに対して0.1%molから20%mol用いる。」という記載があること、そして、薬剤の血中での高い維持を図るために数値範囲を最適化することは当業者の通常の創作能力の発揮にすぎない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PCT

特許協定に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 9/127, 47/48, 39/395, A61P 35/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/64413</p> <p>(43) 国際公開日 2000年11月2日(02.11.00)</p>						
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02596</p> <p>(22) 国際出願日 2000年4月20日(20.04.00)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平11/115737</td> <td>1999年4月23日(23.04.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/115738</td> <td>1999年4月23日(23.04.99)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)[JP/JP] 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)</p> <p>田川俊明(TAGAWA, Toshiaki)[JP/JP] 細川斉子(HOSOKAWA, Saiko)[JP/JP] 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱東京製薬株式会社 横浜研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 松山直行, 外(MATSUYAMA, Naoyuki et al.) 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱東京製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p>		特願平11/115737	1999年4月23日(23.04.99)	JP	特願平11/115738	1999年4月23日(23.04.99)	JP	<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平11/115737	1999年4月23日(23.04.99)	JP						
特願平11/115738	1999年4月23日(23.04.99)	JP						
<p>(54)Title: ANTIBODY AND POLYALKYLENE GLYCOL-BONDED LIPOSOME</p> <p>(54)発明の名称 抗体およびポリアルキレングリコール結合リボソーム</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A liposome constructed by bonding a compound having a polyalkylene glycol moiety to a liposome, which has been converted into maleimide in a part of lipid ends, via a thioether group and further bonding an antibody via the thioether group, wherein the ratio of the bonded compound and the bonded antibody are respectively from 15 to 50 % by mol and from 0.1 to 2 % by mol each per mol of the maleimide lipid contained in the liposome. This liposome is excellent both in the retentivity in the blood and therapeutic effect.</p>								

(57)要約

脂質末端の一部がマレイミド化されたりボソームに、ポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオエーテル基を介して結合し、さらに抗体をチオエーテル基を介して結合したリボソームであって、該化合物の結合量及び該抗体の結合量がそれぞれリボソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 50 モル % 及び 0.1 ~ 2 モル % であるリボソーム。該リボソームは優れた血中滞留性と治療効果を併せもつ。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明細書

## 抗体およびポリアルキレングリコール結合リポソーム

## 5 技術分野

本発明は、リポソームに関する。より具体的には、抗体及び／又はポリアルキレングリコールが結合されており、優れた血中滞留性と治療効果を併せもつリポソームに関する。

10

## 背景技術

薬剤を特定部位に大量に輸送する手段として、リポソームに薬剤を封入し、その表面に抗体を結合する方法が提案されている。特に、癌治療の分野において、  
15 抗腫瘍剤を封入した抗体結合リポソームの有効性が数多く報告されている (Konno et al., Cancer Res., 47, 4471, 1987; 特開昭58-134032号公報)。さらに、リポソームの問題点、すなわち封入物の漏出や、リポソームの凝集及び網内系器官での捕捉などを改善する  
20 方法として、リポソームにポリエチレングリコールを結合する方法が提案されている (特開平1-249717号公報、特開平2-149512号公報、Klibanov et al., FEBS Lett., 268, 235, 1990)。

特開平4-346918号公報には、薬剤を内包するリポソーム表面のマレイミド基と、各々のチオール基を介して結合する蛋白質及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物残基を有することを特徴とする薬剤含有蛋白質結合リポソームが開示されている。このリポソームは、リポソーム表面のマレイミド基に対して、抗  
25

体に結合したチオール基とポリアルキレングリコール部分を含む化合物に結合したチオール基とを反応させることによって製造され、従来のリポソームでみられたような肝臓、脾臓などの網内系での非特異的取り込みが抑制されており、選択的な化学療法を達成できるという特徴がある。

上記公報には、リポソームに結合するポリアルキレングリコール部分を含む化合物の量は具体的に説明されていないが、マレイミド基（マレイミド化脂質）1モルに対して0.1モル%から20モル%のチオール化抗体を反応させ、残存したマレイミド基に対して過剰量のチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物、好ましくは2倍等量以上を加え抗体結合ポリアルキレングリコール修飾リポソームを得ることが記載されている（0016段落）。また、実施例に具体的に記載されたリポソームの製造方法では、全脂質100mgに対して5 $\mu$ モルのチオール化ポリエチレングリコール部分を含む化合物（換算すると全脂質に対して3.1モル%）を反応させており、脂質に対して大過剰のチオール化ポリエチレングリコール部分を含む化合物を反応させることにより、理論量（リポソーム表面に残存したマレイミド基の量）のポリエチレングリコールで修飾されたリポソームを得ているものと考えられる。

また、上記公報には、リポソームに結合する抗体の量も具体的に説明されていないが、マレイミド基（マレイミド化脂質）1モルに対して0.1モル%から20モル%のチオール化抗体（換算すると全脂質100mgに対して0.3～60mg）を反応させることが



説明されているが、実施例に具体的に記載されたりポソームの製造方法では、全脂質 100 mg に対して 5 mg（換算するとマレイミド化脂質に対して 1.7 モル %）の抗体を結合させており、上記公報には、それ  
5 以外の結合量についての具体的開示はない。

#### 発明の開示

本発明者らは、特開平 4-346918 号公報に記載されたりポソームを基にして、さらに高い血中滞留性を有す  
10 るとともに、安全性に優れたりポソームを提供すべく鋭意研究を行った。その結果、特開平 4-346918 号公報に記載されたりポソームにおいて、りポソームを修飾するポリアルキレングリコールの量を理論値（りポソーム表面に残存したマレイミド基の量）よりも低減さ  
15 せたところ、驚くべきことに、修飾量が理論値よりも少ないりポソームにおいても従来公知のりポソームとほぼ同等の血中滞留性が得られることを見出した。

また、本発明者らは、特開平 4-346918 号公報に記載されたりポソームを基にして、さらに高い治療効果を  
20 達成できるりポソームを提供すべく鋭意研究を行った。その結果、特開平 4-346918 号公報の実施例に記載されたりポソームにおいて、抗体の結合量を低減させたところ、驚くべきことに、上記公報の実施例に記載されたりポソームよりもはるかに高い治療効果を達成でき  
25 ることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、脂質末端の一部がマレイミド化されたりポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオエーテル基を介して結合したりポソ

ームであって、該化合物の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 50 モル % であるリポソーム；該化合物の結合量がマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 30 モル % である該リポソーム；該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより得られるリポソームである該リポソーム；該化合物がリポソームの表面に結合した該リポソーム；ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである該リポソーム；該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する化合物である該リポソーム；ポリエチレングリコールの分子量が 2,000 ~ 7,000 ダルトンである該リポソーム；ポリエチレングリコールの分子量が約 5,000 ダルトンである該リポソーム；リポソームの表面にさらに抗体が結合した該リポソームが提供される。

また、脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームに抗体をチオエーテル基を介して結合したリポソームであって、該抗体の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 0.1 ~ 2 モル % であるリポソーム；該抗体の結合量がマレイミド化脂質 1 モルに対して 0.4 ~ 0.7 モル % である該リポソーム；該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである該リポソーム；抗体が GAH 抗体である該リポソーム；抗体が抗体フラグメントが F (a b') である該リポソーム；リポソームの表面にさらにポリアル

キレングリコール部分を含む化合物が結合した該リポソームが提供される。

また、脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物及び抗体をチオエーテル基を介して結合したリポソームであって、該化合物の結合量及び該抗体の結合量が、リポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ～ 30 モル % 及び 0.4 ～ 0.7 モル % であるリポソーム；該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより得られるリポソームである該リポソーム；該化合物がリポソームの表面に結合した該リポソーム；ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである該リポソーム；該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する化合物である該リポソーム；ポリエチレングリコールの分子量が 2,000 ～ 7,000 ダルトンである該リポソーム；ポリエチレングリコールの分子量が約 5,000 ダルトンである該リポソーム；該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである該リポソーム；抗体が GAH 抗体である該リポソーム；抗体が抗体フラグメントが F(a b') である該リポソームが提供される。

また、癌治療薬である該リポソーム；癌種が胃癌又は大腸癌である該癌治療薬；該リポソームを用いた癌治療方法が提供される。

## 図面の簡単な説明

第 1 図は、リポソーム（D X R 封入、抗体非結合）に結合したポリエチレングリコール量と血漿中 D X R 濃度との関係を示した図である。横軸は P E G 量（D P P C 1 モルに対するモル %）を示す。全脂質に対するモル % 及びマレイミド化 D P P E 1 モルに対するモル % の換算値は、それぞれ 0 . 1 6 及び 8 . 9 （ 0 . 2 5 ） ; 0 . 3 2 及び 1 7 . 8 （ 0 . 5 ） ; 0 . 4 8 及び 2 6 . 7 （ 0 . 7 5 ） ; 0 . 6 4 及び 3 5 . 6 （ 1 ） ; 並びに 0 . 8 1 及び 4 5 （ 1 . 2 5 ） である（カッコ内は D P P C 1 モルに対するモル % を示す）。

第 2 図は、リポソーム（D X R 封入、抗体結合）に結合したポリエチレングリコール量と血漿中 D X R 濃度との関係を示した図である。横軸は P E G 量（ 1 0 0 m g 脂質に対する P E G 量（m g））を示す。D P P C 1 モルに対するモル %、全脂質に対するモル %、及びマレイミド化 D P P E 1 モルに対するモル % の換算値は、それぞれ 0 . 2 5、0 . 1 6、及び 8 （ 2 . 5 ） ; 0 . 5 0、0 . 3 1、及び 1 7 （ 5 ） ; 0 . 7 5、0 . 4 7、及び 2 6 （ 7 . 5 ） ; 並びに 1 . 0、0 . 6 2、及び 3 4 （ 1 0 ） である（カッコ内は 1 0 0 m g 脂質に対する P E G 量（m g）を示す）。

第 3 図は、リポソーム（D X R 封入）に結合した抗体量と腫瘍抑制効果（ % T / C ）との関係を示した図である。

第 4 図は、抗体結合量を 2 m g / 1 0 0 m g 脂質以上とした各サンプルについて血漿中 D X R 量（血中滞留性）と抗体結合量との関係を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、天然レシチン（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン）やジパルミトイルフォスファチジルコリン（DPPC）、ジミリストイルフォスファチジルコリン（DMPC）、ジステアロイルフォスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルフォスファチジルコリン（DOPC）、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（DPE）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジパルミトイルフォスファチジン酸（DPPA）、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール（DPPG）、ジミリストイルフォスファチジン酸（DMPA）等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等の糖脂質、脂肪酸、両親媒性ジアルキルジメチルアンモニウム（dialkyl dimethylammonium amphiphiles）、ポリグリセロールアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等（Liposome Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993）、アルキルグリコシド、アルキルメチルグルカミド、アルキルシュークロースエステル、ジアルキルポリオキシエチレンエーテル、ジアルキルポリグリセロールエーテル等（Liposome Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993）、ポリオキシエチレンーポリ乳酸等の両親媒性ブロック共重合体等（特表平6-508831号公報）などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。これらの脂質は単独で、又は2種以上を組み合わせ用いることができ、さらにコレステロール等の非極性物質、DC

- c h o l ( 3  $\beta$  - [ N - ( N ' , N ' - d i m e t h y l a m i n o e t h y l ) c a r b a m o y l ] c h o l e s t e r o l ) 等のコレステロール誘導体と組み合わせ用いてもよい。

5      本発明のリポソームにおいては、ポリアルキレングリコールを含む化合物及び必要に応じて抗体などの蛋白質の結合のために、脂質成分の一部として、例えばマレイミド化フォスファチジルエタノールアミンなどのマレイミド化された脂質（本明細書において「マレイミド化脂質」と呼ぶ。）を用いる必要がある。全脂  
10      質に対するマレイミド化脂質の割合は、通常、約 0 . 5 ～ 1 0 モル % である。

マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンの例で説明すると、この化合物はアミノ基に反応性を有するマレイミド含有化合物とフォスファチジルエタノールアミン（P E）のアミノ基との反応により得られる。  
15      該マレイミド含有化合物はカプロイル基、ベンゾイル基、フェニルブチリル基等の残基を含んでいてもよく、例えば、N - (  $\epsilon$  - マレイミドカプロイルオキシ ) スクシンイミド、N - サクシンイミジル 4 - ( p  
20      - マレイミドフェニル ) ブチレート、N - サクシンイミジル 4 - ( p - マレイミドフェニル ) プロピオネート、N - (  $\gamma$  - マレイミドブチリルオキシ ) スクシンイミド等を挙げることができる。P E としてはジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（D P P  
25      E）、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン（D M P E）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン（D O P E）等のフォスファチジルエタノールアミン類が使用できるが、好ましくは D P P E である。脂質成分として、さらにステアリルアミン、

ジセチルフォスフェートなどの荷電性物質を含んでいてもよい。また、本発明のリポソームは、ウイルスの一部または全部を組み込んだ融合リポソーム、例えばセンダイウイルスとリポソームを融合したリポソーム  
5 であつてもよい。

典型的なリポソームとしては、例えば、フォスファチジルコリン 1 モルに対して、コレステロールを 0 . 3 ~ 1 モル、好ましくは 0 . 4 ~ 0 . 6 モル、マレイミド化フォスファチジリエタノールアミンを 0 . 0 1  
10 ~ 0 . 2 モル、好ましくは 0 . 0 2 ~ 0 . 1 モル、さらに好ましくは 0 . 0 2 ~ 0 . 0 5 モルを含む脂質組成物を用いることができ、フォスファチジン酸を加える場合には 0 . 4 モル以下、好ましくは 0 . 1 5 モル以下の脂質組成物を用いることができる。

15 本発明のリポソームの製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。また、本発明のリポソームの形態も特に限定されず、いかなる形態であつてもよい。例えば、ガラス壁に付着させた脂質薄膜に水溶液を加え、機械的振盪を加えて形成するマルチラメラリポソーム ( M L V ) ; 超音波処理法、エタノール注入法、フレンチプレス法により得られるスモールユニメラリポソーム ( S U V ) ; 界面活性剤除去法、逆相蒸発法 ( リポソーム、砂本順三ら、南江堂、1998 ) 、 M L V を均一孔径を有するメン  
20 ンブランから加圧により押し出すイクストルージョン法等によって得られるラージュユニメラリポソーム ( L U V ) のいずれであつてもよい ( Liposome Technology 2nd edition vol.1, 141, 1993 ) 。リポソームの粒径は、例えば、300 nm 以下、好ましくは 30  
25

から 200 nm 程度である。

本発明のリポソームには医薬を封入することができる。医薬の種類は特に限定されないが、例えば、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノマイシン、  
5 ビンブラスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル（5-FU）等の抗腫瘍剤；チモロール等のアドレナリン遮断剤；クロニジン等の高血圧剤；プロカインアミド等の制吐剤；クロロキニーネ等の抗マラリア剤；並びにそれらの薬学的に許容し得る塩及び誘導  
10 体；レニウム 186、ヨード 131、イットリウム 90 等の放射性物質；リシン A、ジフテリアトキシン、TNF などの生理活性物質及びそれらをコードする DNA などを用いることができる。もつとも、本発明のリポソームに封入可能な医薬はこれらに限定されること  
15 はない。

上記医薬の薬学的に許容し得る塩としては、薬学的に許容し得る多価陰イオン性物質との塩、例えば、クエン酸塩、酒石酸塩、グルタミン酸塩、及びそれらの誘導体との塩が好ましい。本発明のリポソームに封入  
20 する医薬としては、抗腫瘍剤が好ましい。本発明のリポソームには、治療用の医薬のほか、診断用の医薬を封入することもできる。診断用の医薬としては、放射性元素、例えばインジウム、テクネチウム等のイメージング薬剤；ヨード、ガドリニウム等の造影剤；ホ  
25 ースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の酵素；ユーロピウム誘導体などの蛍光体；N-メチルアクリジウム誘導体等の発光体などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。



これらの医薬をリポソームに導入する方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。例えば、リポソーム形成時に水溶液として添加してリポソーム内部に封入してもよい。また、リポソーム形成後、ベジクル内外にpH勾配などの濃度勾配を形成し、このポテンシャルを駆動力としてイオン化可能な薬剤をリポソーム内部に取り込ませる方法（Cancer Res., 49, 5922, 1989; BBA, 455, 269, 1976）などを用いることができる。

10 本発明のリポソームは、ポリアルキレングリコール部分を含む化合物で修飾されており、さらに特定量の抗体で修飾されていることを特徴としている。ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコールなどを用いることができるが、ポリエチレングリコールを用いることが好ましい。ポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量が2,000～7,000ダルトン程度のもの、好ましくは約5,000ダルトン程度のものを用いることができる。

20 本発明のリポソームは、上記ポリアルキレングリコール部分を含む化合物がリポソーム表面のマレイミド化脂質にチオエーテル結合を介して結合した形態を有しているが、通常、ポリアルキレングリコールを含む化合物にチオール基を導入した後、この化合物をリポソームのマレイミド基と反応させることにより、ポリアルキレングリコールを結合させたリポソームを製造することができる。ポリアルキレングリコールを含む化合物としては、通常、ポリエチレングリコール基を有し、かつ末端をチオール化可能な化合物又は末端に

メルカプト基を有する化合物を挙げることができる。具体的には、例えば、ポリアルキレングリコール基をトリアジンに結合した化合物、さらに該トリアジンがアミノ酸などにより置換された化合物を挙げることができる。この際、ポリアルキレングリコール基を2つ有する化合物（2本鎖）であってもよい。

ポリアルキレングリコールとしてポリエチレングリコールを用いる場合には、例えば、モノメトキシポリオキシエチレンアミンと各種チオールカルボン酸とを脱水縮合する方法；モノメトキシポリオキシエチレンアミンにSPDPでピリジルジチオプロピオニル基を導入し、さらに還元する方法；モノメトキシポリオキシエチレンアミンにイミノチオランによりチオール基を導入する方法；モノメトキシポリオキシエチレンカルボン酸の活性エステルと各種チオールアミンを結合させる方法；ポリエチレングリコールトリアジン誘導体をチオールアミンと縮合する方法などを利用することができる。さらに具体的には、2,4-ビス（ポチエチレングリコール）-6-クロロ-s-トリアジン（活性化PEG 2（生化学工業株式会社製））をシスチンと反応させ、さらに還元してシステイン結合活性化PEG 2を得ることができる。

本発明のリポソームにおけるポリアルキレングリコール部分を含む化合物の導入量は特に限定されず、残存マレイミド化脂質に対して過剰に反応させてもよいが、ポリアルキレングリコールの好ましい導入量としては、全脂質に対して0.28～0.90モル％程度、より好ましくは0.28～0.56モル％程度、マレイミド化脂質に対しては15～50モル％程度、より

好ましくは 15 ～ 30 モル % 程度であり、DPPC に対して 0.44 ～ 1.45 モル % 程度、より好ましくは 0.44 ～ 0.89 モル % 程度である。

- 5 本発明のリポソームは蛋白質、すなわち抗体で修飾されている。蛋白質としては、例えば、抗体、FGF、EGFなどの種々の生理活性物質を用いることができるが、好ましくは抗体を用いることができる。
- 10 抗体としては、抗体自体又は抗体フラグメント、又は抗体誘導体などを用いることができるが、抗体としては、抗体自体、又は抗体フラグメントのいずれを用いてもよい。本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗体自体及び抗体フラグメントのほか、誘導化又は修飾した抗体などを包含しており、最も広義に解釈しなければならない。また、抗体としては、治療対象となる組織、細胞、細菌、ウイルス等と反応性を有する抗体を利用することができる。例えば、各種動物のポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ヒトマウスのキメラ抗体、ヒトモノクローナル抗体などを用いることができる。異種動物の蛋白質ではない点から、ヒトモノクローナル抗体がより好ましい。
- 15 抗体としては、特開平5-304987号公報に記載されたヒトモノクローナル抗体（GAH抗体）を好適に用いることができ、例えば、上記公報の例7に具体的に示された方法に従って、GAH抗体で修飾したリポソームを製造することができる。特開平5-304987号公報に記載のとおり、GAH抗体は、胃癌及び大腸癌に反応性を有するので、本願のリポソームは胃癌や大腸癌等の癌治療薬として有用である。抗体の種類と封入すべき医薬との組み合わせを適宜選択することにより、
- 20
- 25

治療効果に優れたリポソームを製造することができる。

抗体にチオール基を付与した後、リポソームのマレイミド基と該チオール化抗体とを反応させることによって、リポソームを抗体で修飾することができる。抗

5 体へのチオール基の付与は、抗体のアミノ基に対して、蛋白質のチオール化に通常用いるN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピネート(SPD P)(Carlsson, J., et al., Biochem. J., 173, 723, 1978)やイミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート

10 (Traut, R.R., et al., Biochemistry, 12, 3266, 1973)等の化合物を反応させる方法により行なうことができる。また、抗体の内在性ジチオール基を還元してチオール基として反応させることもでき、抗体活性の維持の点から内在性チオール基を用いる方法は好適である。

例えば、IgGを用いる場合はペプシン等の酵素でF(ab')<sub>2</sub>化し、さらにジチオスレイトール等で還元して得られるF(ab')<sub>2</sub>に生じるチオール基をリポソームとの結合反応に利用することができる(Martin, F.J., et al., Biochemistry, 20, 4229, 1981)。

20 IgMの場合には、ミラーらの方法(J. Biol. Chem., 257, 286, 1965)に準じ、緩和な条件でJ鎖を還元して得られるIgMsのFc部分のチオール基をリポソームとの結合に利用すればよい。特開平5-304987号に

25 記載されたGAH抗体を用いる場合には、F(ab')<sub>2</sub>を用いることが好適である。チオール基が付与された抗体などの蛋白質とマレイミド基を含むリポソームとの結合は、中性の緩衝液(pH 6.5~7.5)中で2~16時間反応させることにより達成される。

本願の最も好ましい実施態様は、抗体及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合されたりポソームであり、これを製造するためには、まず、マレイミド基を有するリポソームに対して中性の緩衝液中でチオール化抗体を反応させる。例えば、リポソームを構成する全脂質 100 mg あたり 0.5 ~ 5.3 mg、0.5 ~ 4.5 mg、好ましくは 1.2 ~ 2 mg の抗体が結合するように、すなわちチオール化抗体をマレイミド基（マレイミド化脂質）1 モルに対して、

5 0.1 モル %（具体的には 0.17 モル %）から約 2 モル % 程度（具体的には 1.5 モル %、1.8 モル %）、好ましくは 0.4 ~ 0.7 モル % 反応させればよい。ついで、残存しているマレイミド基に対してチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を反応

15 させ、抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合したりポソームを製造することができ、具体的には、マレイミド化脂質基 1 モルに対して、15 モル % から 50 モル %、好ましくは 15 ~ 30 モル %（全脂質に対して 0.28 ~ 0.90 モル %、好

20 ましくは 0.28 ~ 0.56 モル %、DPPC を用いる場合には、DPPC に対して 0.44 ~ 1.45 モル %、好ましくは 0.44 ~ 0.89 モル %）のチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を加え、抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化

25 合物が結合したりポソームを製造することができる。

本発明のリポソームの好ましい態様により、医薬、好ましくはドキソルビシンなどの抗腫瘍剤が封入されており、ポリエチレングリコール部分を含む化合物と抗腫瘍抗体とが結合したりポソームが提供される。上

記の医薬含有リポソームは、公知の方法、例えば、脱水法（特表平2-502348号公報）、安定化剤を加え液剤として用いる方法（特開昭64-9331号公報）、凍結乾燥法（特開昭64-9931号公報）等により製剤化することが

5      でき、癌などの各種疾患の治療のために、血管内投与、  
膀胱内投与、腹腔内投与、局所投与などの方法で患者  
に投与することができる。投与量は有効成分の医薬の  
種類に応じて適宜選択することができるが、例えばド  
キソルビシンを封入したリポソームを投与する場合に  
10    は、有効成分量として  $50 \text{ mg} / \text{kg}$  以下、好ましく  
は  $10 \text{ mg} / \text{kg}$  以下、より好ましくは  $5 \text{ mg} / \text{kg}$   
以下で用いることができる。

## 实施例

15      以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

## 实施例 1

## 20 (1) リポソームの調製及び薬物の封入

25 ジパルミトイルフォスファチジルコリン(D P P C) / コレステロール /  $\epsilon$ -マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(M C - D P P E) (18 / 10 / 0.5モル比) からなる脂質混合物(1.6 g)に0.3 Mクエン酸緩衝液(pH 4.0) 16 mLを添加し、水和した後、液体窒素と60℃の温浴で凍結融解を3回行ないマルチラメラリポソームを作製した。さらに押出し法により0.1  $\mu$ mに整粒した。このリポソーム溶液に1 M NaOH

を滴下して中和した後、60℃に加温し、20 mg / mL のドキソルビシン (DXR、別名アドリアマイシン、ADM) 水溶液を脂質 100 mg あたり 0.5 mL 添加して封入した。

5 (2) 抗体のチオール化及びリポソームへの結合 (抗体結合リポソームの作製)

1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した GAH 抗体 (特開平 4-346918 号公報、特開平 5-304987 号公報に記載の  
10 もの、胃癌及び大腸癌反応性モノクローナル抗体、3 mg / mL、14.4 mL) に 3 mg / mL のイミノチオランを 92.4  $\mu$ L 添加し、37℃で1時間反応させてチオール基を導入した (Biochemistry, 12, 3206, 1973 参照)。反応液をゲルろ過し、緩衝液を 1 mM  
15 EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に交換した後、ドキソルビシン 1 mg あたり 0.21 mg のチオール化抗体 (1.7 mg / mL) を加えて 25℃で1時間反応させ、リポソームに抗体を結合させた。

20 (3) ポリエチレングリコールのチオール化及びリポソームへの結合 (PEG 結合リポソームの作製)

特開平 4-346918 号公報の方法に従って、2, 4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンにシスチンを反応後、還元してチオール基を有する  
25 ポリエチレングリコール (2 本鎖型の PEG) を調製した。すなわち、シスチンを用いてチオール化 PEG (30 mg / mL、PEG 分子量 2000 の 2 本鎖型 (PEG 2000) 又は PEG 分子量 5000 の 2 本鎖型 (PEG 5000)) を製造し、上記の反応液

1 mLあたり0.18 mL添加して、10℃で結合反応を行なった。反応開始後5～240分後にサンプリングしてセファロースCL6Bカラムにアプライし、未反応のチオール化PEGを除いて反応を停止し、PEG量の異なるイムノリポソームを作製した。PEG非結合イムノリポソームは、PEG結合操作をしていないイムノリポソームを同様にセファロースCL6Bでゲルろ過することで作製した。

#### (4) 抗体及びPEG結合リポソームの作製

上記(2)で調製した抗体結合リポソームに対し、上記(3)中のチオール化PEGを反応させることで抗体及びPEGの結合したリポソームを作製した。

#### (5) 結合PEG量の定量

イムノリポソームに結合したPEG量はHPLC法により測定した。終濃度2%SDS溶液としたイムノリポソーム溶液を60℃で30分間加温し、リポソームを完全に可溶化した。GPCカラム(東ソー株式会社製、2000SWXL)を用い、pH7.5の緩衝液(25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1% SDS、70%メタノール)で溶離してPEGを分離し、215 nmで検出してエリア値から定量した。

#### (6) DXR定量

サンプル50 μLを50%プロパノール/0.5 M塩酸950 μLに添加し、500 nmの吸光度を測定してDXRを測定した。

#### (7) 結合抗体量の定量

PEG量の定量と同様にして、GPCカラム(東ソー株式会社製、3000SWXL)を用い、pH7.0の緩衝液(25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、200 mM Na



、S O<sub>4</sub>、0.1% S D S ) で溶離して抗体を分離し、抗体ピークの280 nmで検出されるエリア値から定量した。

(8) 脂質量の定量

- 5 脂質 (D P P C 及びコレステロールの総量) は H P L C 法により定量した。L-カラム O D S (化学品検査協会) 4.6 mm × 250 mm に負荷し、テトラヒドロフラン (T H F) / アセトニトリル / 水 (2 : 1 : 1、V / V / V、0.1% トリフルオロ酢酸) で溶離
- 10 した。215 nm で検出を行ない、D P P C に由来するピーク及びコレステロールに由来するピークのエリア値から定量した。脂質定量用サンプルはリポソームサンプル1容に対して上記溶離液9容を加えて調製した。

15

実施例2 : P E G 結合リポソームの作製 (体内動態試験)

- 実施例1の方法に従って、リポソームを構成する全脂質1モルに対して0～約0.7モル%、D P P C 1
- 20 モルに対して0～約1モル%、マレイミド化脂質1モルに対して0～約40モル%のP E Gを導入したリポソーム (D X R 封入、抗体非結合、P E G 2000又はP E G 5000 結合) を調製した。

< 表 1 >

リポソーム	D X R 濃度 (mg/ml)	P E G 量*	P E G 量**	P E G 量* *
1	1.14	0.083(PEG5000)	0.13	4.61
2	1.17	0.22 (PEG5000)	0.34	12.2
3	1.27	0.40 (PEG5000)	0.63	22.2
4	1.32	0.48 (PEG5000)	0.75	26.7
5	1.16	0.096(PEG2000)	0.15	5.33
6	1.08	0.30 (PEG2000)	0.47	16.7
7	1.47	0.60 (PEG2000)	0.94	33.3
8	1.55	0.70 (PEG2000)	1.09	38.9
9	3.49	-	-	-

\* 全脂質に対するモル%

\*\* D P P C 1 モルに対するモル%

\*\*\* マレイミド化脂質 D P P E 1 モルに対するモル%

5 B A L B / c A j c l 雄性マウス (6 週 齢) を実験に使用した。各リポソームについて 1 群 4 匹とし、ブランクとして非処理マウス 1 匹を実験に供した。D X R 量として 2 m g / k g となるように尾静脈内にリポソームを投与した。投与 1 6 時間後、マウスにネンブ

10 血漿 1 0 0  $\mu$  L に 0 . 3 M 塩酸 - 5 0 % エタノール (塩酸エタノール) 1 m L を加え、6 0  $^{\circ}$  C で 1 0 分間加熱して D X R を抽出し、4  $^{\circ}$  C に冷却して 1 5 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心して上清を採取した。この試料を塩酸エタノールで 4 倍に希釈し、励起波長 4 9 0 n m 、

15 m 、蛍光波長 5 9 0 n m の蛍光を測定した。塩酸エタノールで希釈した既知濃度の D X R を用いて検量線を作製し、血漿中の D X R を定量した。なお、マウス血漿からの D X R 回収率は、D X R 換算 3 . 7 5  $\mu$  g / m L ~ 3 0  $\mu$  g / m L の範囲において 9 5 ~ 9 8 % で

あった（参考文献：Cancer Res., 47, 4471, 1989）。

各リポソーム群についての血漿中DXR濃度の平均値（±標準偏差）を第1図に示す。リポソームの血中滞留性の指標となる血漿中DXR濃度は、PEG5000及びPEG2000とともに、リポソームに結合したPEG量に依存して増加することが確認された。

実施例3：PEG及び抗体結合リポソームの作製（体内動態試験）

10 実施例1の方法に従って、リポソーム全脂質に対して0～0.6モル%、DPPCに対して0～約1モル%、マレイミド化DPPEに対して0～約30モル%のPEGを導入したリポソーム（DXR封入、抗体結合、PEG5000結合）を調製した。

15 <表2>

リポソーム	DXR濃度 (mg/100mg脂質)	抗体 (mg/100mg脂質)	PEG 量*	PEG 量**	PEG 量***
1	10.2	1.5	0	0	0
2	10.4	1.6	0.06	0.10	3
3	10.3	1.6	0.10	0.16	5
4	10.3	1.6	0.15	0.24	8
5	11.1	1.6	0.28	0.44	15
6	10.5	1.6	0.30	0.48	16
7	10.2	1.6	0.36	0.56	19
8	11.0	1.8	0.48	0.76	26
9	10.8	1.3	0.52	0.82	28
10	10.8	1.7	0.61	0.97	33

\* 全脂質に対するモル%

\*\* DPPC 1モルに対するモル%

\*\*\*マレイミド化DPPE 1モルに対するモル%

実施例2と同様にして血漿中のDXRを定量した。各リポソーム群についての血漿中DXR濃度の平均値

(±標準偏差)を第2図に示す。血漿中DXR濃度は、リポソームに結合したPEG量に依存して増加したが、全脂質に対して約0.3モル%、DPPCに対して約0.5モル%、マレイミド化DPPCに対して約17モル%の導入量でプラトーに達することが確認できた。なお、リポソームからDXRが漏れた場合には、漏出したDXRは血中から速やかに焼失することが確認されているので、実施例2及3の結果に示された血漿中DXR濃度は、リポソームに封入されたDXRに由来するものであると考えられる。

実施例4：PEG及び抗体結合リポソームの作製（薬効試験、動態試験）

実施例1の方法に従って、リポソーム全脂質100mgに対して抗体を0.5、1.2、2.0、4.5、5.3、及び11.4mg結合させた下記のリポソーム2～7（DXR封入、PEG5000結合）を調製した。同様にして、抗体を結合していないリポソーム1を製造した。なお、PEG結合リポソームでは、PEG結合量範囲（>4.4mg/100mg脂質）において各リポソームの血中滞留性は同等であるため、以下に示す実験結果は抗体結合量に依存する。

<表3>

リポソーム	抗体結合量 mg/100mg 脂質	D X R 封入量 mg/100mg 脂質	P E G 結合量 mg/100mg 脂質
1	0	9.5	8.2
2	0.5	9.1	8.2
3	1.2	9.5	8.1
4	2.0	8.9	5.3
5	4.5	9.6	6.2
6	5.3	9.7	6.4
7	11.4	10.0	3.2

胃癌細胞株 M K N 4 5 をヌードマウスの背側 2 ヶ所  
 (  $1 \times 10^6$  細胞 / 1 ヶ所 ) に皮下移植した。「薬効試験」においては、腫瘍の長径、短径の測定が可能な十分な大きさに達した時点に、抗体結合量の異なるリポソームの投与を開始した。リポソームの投与量は、1 回あたり 5 . 0 m g / k g ( D X R 量換算 ) とし、陽性対照として D X R 投与群 ( 5 . 0 m g / k g ) を設け、コントロール群には生理食塩水を投与した。全群につき、投与開始日 ( 0 日 ) 、 3 日目、及び 6 日目に静脈内投与を行なった。

経時的に腫瘍径 ( 長径、短径 ) を測定し、推定腫瘍重量 (  $\text{短径}^2 \times \text{長径} / 2$  ) を算定した。3 回の投与終了後、1 9 日目まで測定を継続した。各腫瘍の投与開始日の推定腫瘍重量を 1 . 0 として腫瘍増殖度を算出し、コントロール群、D X R 投与群に対する各処置群の腫瘍増殖抑制効果を評価した。最終測定日 ( 1 9 日目 ) の各処置群について % T / C 値 (  $\text{処置群の腫瘍増殖度} / \text{コントロール群の腫瘍増殖度} \times 100$  ) を算定し、各サンプルの抗体結合量との関係から、腫瘍増殖抑制効果が最大となる抗体結合量 ( 最適値 ) を求めた。

その結果、コントロール群に対しては全ての処置群に有意な腫瘍増殖抑制効果が確認され、D X R 投与群

に対しては、第3図に示すように、結合抗体量が0.5～5.3 mg / 100 mg 全脂質の範囲のサンプルに有意な腫瘍増殖抑制性効果が認められ、抗体結合量として2 mg / 100 mg 全脂質付近をピークとした

5 腫瘍増殖抑制活性が認められた。

「動態試験」においては、マウスに抗体結合量の異なる上記リポソーム4～7（2.0、4.5、5.3、及び11.4 mg / 100 mg 全脂質）を静脈内投与し（一群2～3匹、1.0 mg / kg、DXR量換算）、

10 投与4時間後に各個体から血漿を採取した。実施例2と同様に蛍光測定法により血漿中のDXR量を測定した。各サンプル投与後の血漿中のDXR量を比較し、抗体結合量とDXR封入抗体結合リポソームの血中滞留性との関係を求めた。動態試験において抗体結合量

15 2 mg / 100 mg 脂質以上の各サンプルについて、各サンプル投与後の血漿中DXR量と各サンプルの抗体結合量との関係を求めた（第4図）。その結果、抗体結合量が2 mg / 100 mg 脂質を上回ると、抗体結合量に依存して血中滞留性が低下することが認めら

20 れた。

#### 産業上の利用可能性

本発明のリポソームは、優れた血中滞留性を有しており、しかもポリアルキレングリコールの結合量が従

25 来のリポソームに比べて少ないという特徴がある。したがって、本発明のリポソームは、ポリアルキレングリコールに起因する副作用を回避することができ、また、工業生産性の観点からも有利である。さらに、本発明のリポソームは、従来の抗体結合リポソームに比

べて、優れた治療効果を達成できるという特徴がある。

## 請求の範囲

1. 脂質末端の一部がマレイミド化されたりポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオ  
5 エーテル基を介して結合したりポソームであって、該化合物の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 50 モル%であるリポソーム。
2. 該化合物の結合量がマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 30 モル%である請求項 1 に記載のリポソーム。  
10
3. 該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより得られるリポソームである、請求項 1 又は 2 に記載のリポソーム。  
15
4. 該化合物がリポソームの表面に結合した請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のリポソーム。
5. ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のリポソーム。  
20
6. 該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する化合物である請求項 5 に記載のリポソーム。
7. ポリエチレングリコールの分子量が 2,000 ~  
25 7,000 ダルトンである請求項 6 に記載のリポソーム。
8. ポリエチレングリコールの分子量が約 5,000 ダルトンである請求項 6 に記載のリポソーム。
9. リポソームの表面にさらに抗体が結合した請求項



1 乃至 8 のいずれかに記載のリポソーム。

10 10. 脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームに抗体をチオエーテル基を介して結合したリポソームであって、該抗体の結合量がリポソームに含まれる  
5 マレイミド化脂質 1 モルに対して 0.1 ~ 2 モル % であるリポソーム。

11. 該抗体の結合量がマレイミド化脂質 1 モルに対して 0.4 ~ 0.7 モル % である請求項 10 に記載のリポソーム。

10 12. 該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである、請求項 10 又は 11 に記載のリポソーム。

15 13. 抗体が GAH 抗体である請求項 10 乃至 12 のいずれかに記載のリポソーム。

14. 抗体が抗体フラグメントが F(a b')<sub>2</sub> である請求項 10 乃至 13 のいずれかに記載のリポソーム。

20 15. リポソームの表面にさらにポリアルキレングリコール部分を含む化合物が結合した請求項 10 乃至 14 のいずれかに記載のリポソーム。

25 16. 脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物及び抗体をチオエーテル基を介して結合したリポソームであって、該化合物の結合量及び該抗体の結合量が、リポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して  
15 ~ 30 モル % 及び 0.4 ~ 0.7 モル % であるリポソーム。

17. 該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコ

ール部分を含む化合物とを反応させることにより得られるリポソームである、請求項 16 に記載のリポソーム。

18. 該化合物がリポソームの表面に結合した請求項 5 16 又は 17 に記載のリポソーム。

19. ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項 16 乃至 18 のいずれかに記載のリポソーム。

20. 該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する化合物である請求項 19 に記載のリポソーム。 10

21. ポリエチレングリコールの分子量が 2,000 ~ 7,000 ダルトンである請求項 20 に記載のリポソーム。

22. ポリエチレングリコールの分子量が約 5,000 ダルトンである請求項 20 に記載のリポソーム。 15

23. 該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである、請求項 16 乃至 22 のいずれかに記載のリポ 20 ソーム。

24. 抗体が GAH 抗体である請求項 16 乃至 23 に記載のリポソーム。

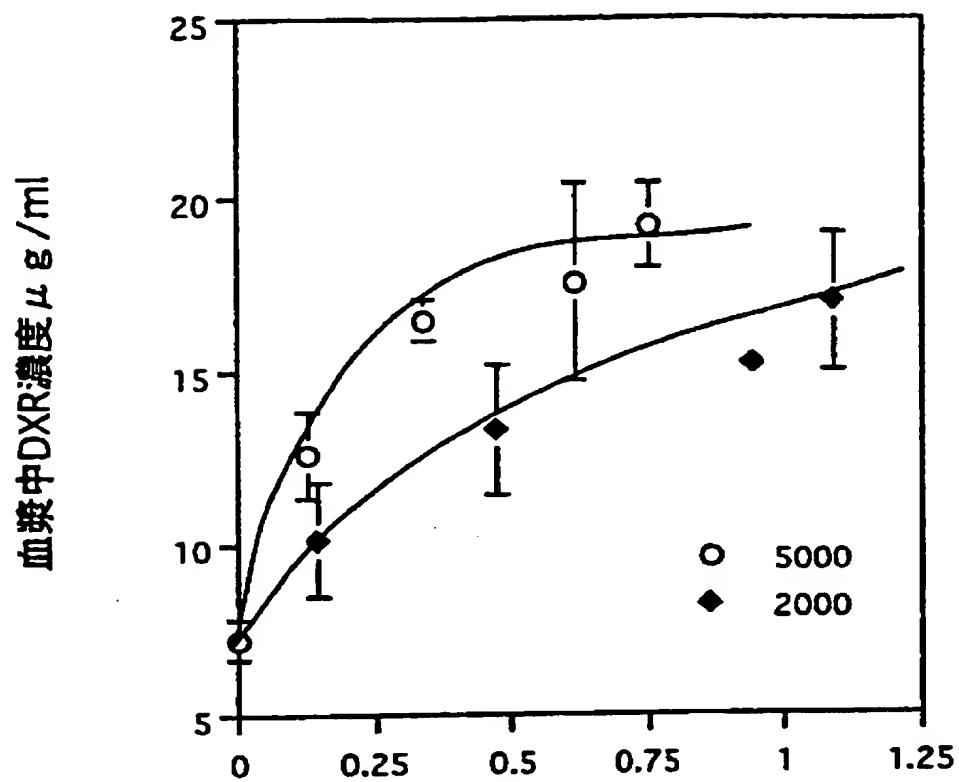
25. 抗体が抗体フラグメントが  $F(a b')$  である請求項 16 乃至 24 のいずれかに記載のリポソーム。

26. 請求項 1 乃至 25 に記載の癌治療薬。 25

27. 癌種が胃癌又は大腸癌である請求項 26 に記載の癌治療薬。

28. 請求項 1 乃至 27 のいずれかに記載のリポソームを用いた癌治療方法。

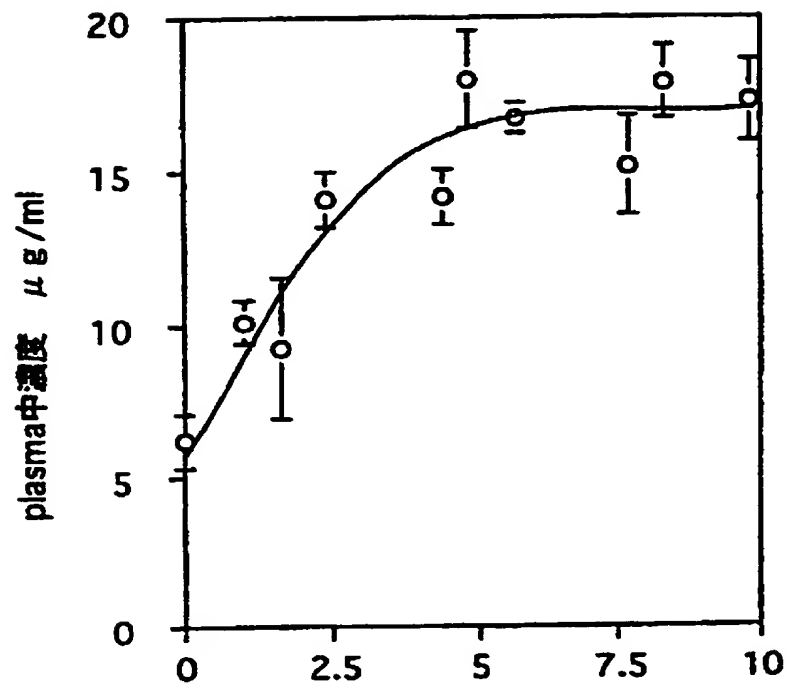
第 1 図



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2 / 4

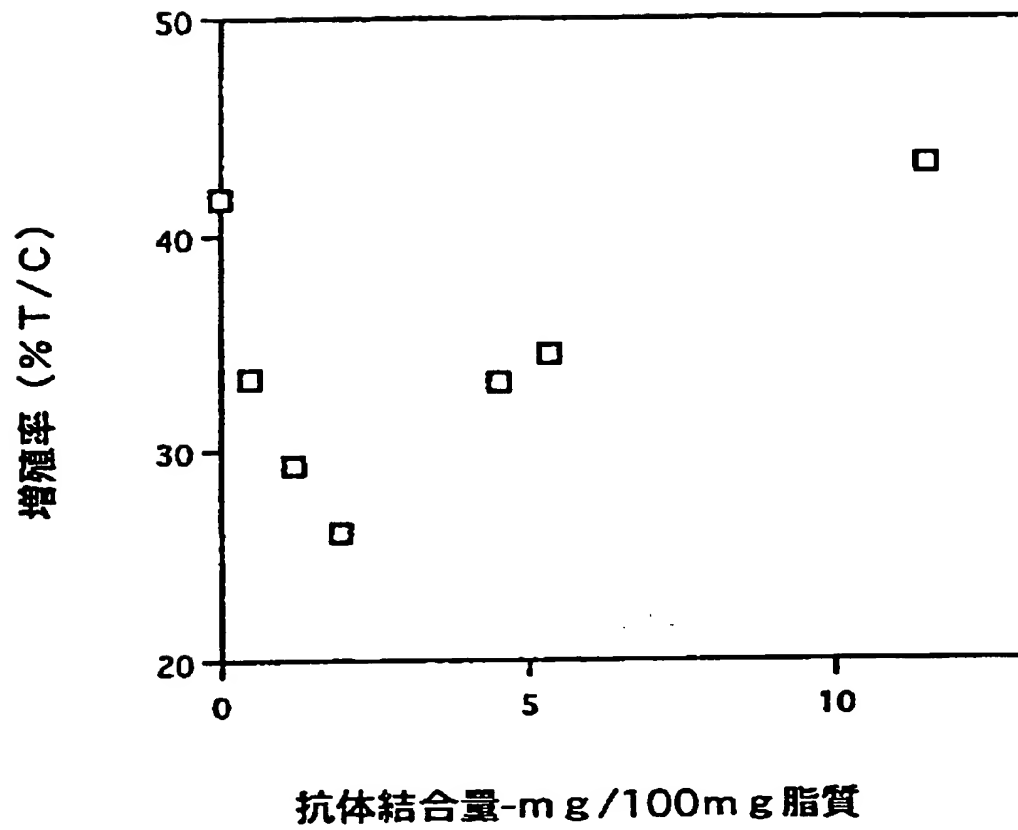
第 2 図



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3 / 4

第 3 図

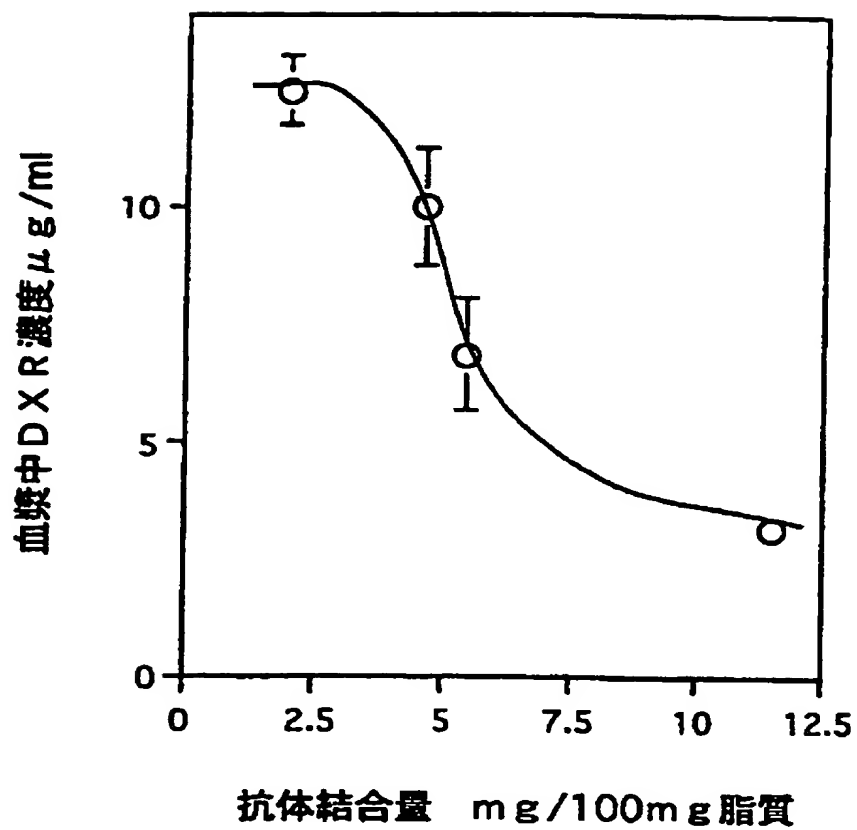


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



4 / 4

第 4 図



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02596

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K9/127, A61K47/48, A61K39/395, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K9/127, A61K47/48, A61K39/395, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 526700, A (Mitsubishi Kasei Corp.), 10 February, 1993 (10.02.93)	10-14
A	& JP, 4-346918, A	1-9, 15-27
A	Biochemistry, 36, (1), 66-75 (1997)	1-27
A	Journal of Controlled Release, 40, (1-2), 101-109 (1996)	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 July, 2000 (18.07.00)

Date of mailing of the international search report  
01 August, 2000 (01.08.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02596

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 28  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 28 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by the International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K9/127, A61K47/48, A61K39/395, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K9/127, A61K47/48, A61K39/395, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 526700, A (Mitsubishi Kasei Corp.) 10. 2月. 1993 (10. 02. 93)	10-14
A	& JP, 4-346918, A	1-9, 15-27
A	Biochemistry, 36, (1), 66-75 (1997)	1-27
A	Journal of Controlled Release, 40, (1-2), 101-109 (1996)	1-27

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 07. 00

国際調査報告の発送日

01.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横尾 俊一

4 P

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 28 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 28 は、治療による人体の処置方法であり、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)に該当するため、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。